

# 快速检测猪肉中单核细胞增多症 李氏菌 PCR 试剂盒的研制

杨百亮 丁 伟

(山西农业大学动医系, 太谷 030801)

薛应照

(山西临猗县动检站, 临猗 044100)

**摘要** 快速检测猪肉中单核细胞增多症李氏菌的 PCR 试剂盒与分离培养法平行检测 156 份猪肉样品, 结果 PCR 的阳性率为 5.8%, 分离培养法的阳性率为 3.8%, 两者符合率为 97%。实验证明, 该试剂盒具有良好的特异性和可重复性, 可测出样品中至少 320CFU 细菌, 并在 2d 内取得结果, 具有推广应用价值。

**关键词** PCR 试剂盒, 单核细胞增多症李氏菌, 猪肉, 检测

单核细胞增多症李氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种重要的人兽共患和食品卫生病原菌, 已引起世界各国的高度重视, 被列为 90 年代食品中四大病原菌之一, 主要通过肉乳及其制品引起人的感染发病。目前采用的检测食品中单核细胞增多症李氏菌的分离培养法费时费力, 需几周时间才能报告结果。近年来发展起来的 PCR 技术为单核细胞增多症李氏菌的快速检测提供了有力手段<sup>[1,2]</sup>, 但国内尚无成套的快速检测商品试剂盒。作者通过对 Taq DNA 聚合酶和引物浓度等条件的标化, 建立了简便、经济、实用的快速检测猪肉中单核细胞增多症李氏菌的试剂盒, 具有良好的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

试验用单核细胞增多症李氏菌 (*L. monocytogenes*) 参考株 54004, 54005, 54006 和 54007 购自中国药品生物制品检定所; 单核细胞增多症李氏菌 (*L. monocytogenes*) 参考株 G53-4、G53-5, 猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 1a、1b、2 型, 巴氏杆菌

(*Pasteurella multocida*) A、B、D 型, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 和变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 购自中国兽医药品监察所; 单核细胞增多症李氏菌 (*L. monocytogenes*) C1 株由中国进出口商品检验技术研究所惠赠; 单核细胞增多症李氏菌 (*L. monocytogenes*)<sup>'58</sup>、small boy、35152、D20、15313 株和其它 5 种李氏菌 (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*) 由加拿大 Saskatchewan 大学的 Deneer 博士赠送; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*), 耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 由解放军农牧大学卫生检验教研室提供。

### 1.2 主要试剂

1.2.1 生化试剂: Taq DNA 聚合酶试剂盒 (美国 PE 公司)。Taq DNA 聚合酶、dNTP、琼脂糖、蛋白酶 K (华美生物工程公司)。

1.2.2 改良 Fraser 增菌液: 胰蛋白胨 52g, 氯化锂 3g, 吡啶橙 0.012g, 枸橼酸铁铵 0.5g, 蒸

本文系山西省青年科学基金和省计委资助项目

1994-09-22 收稿

馏水 1000ml。调 pH7.2。

1.2.3 Butterfield 缓冲液: 0.085g 磷酸二氢钾, 蒸馏水 1000ml, 调 pH7.2。

### 1.3 引物序列

参照 Deneer 等<sup>[2]</sup>设计的引物, 其核苷酸序列分别为: 5'GCATCTGCATTCAATAAAGA3' (Lis-1), 5'TGTCAGTGCATCTCCGTGGT3' (Lis-2), 总长度为 174bp, 由军事医学科学院放射医学研究所合成。

### 1.4 PCR 反应条件

总反应体积为 20 $\mu$ l, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 $\mu$ mol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2 $\mu$ l, DNA 溶液 5 $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 5—6U (华美公司产) 或 3U (PE 公司产), 引物 1 $\mu$ mol/L, 用水补至 20 $\mu$ l。反应按 95 $^{\circ}$ C 1min (变性), 55 $^{\circ}$ C 1min (复性), 72 $^{\circ}$ C 1min (延伸) 顺序, 反复扩增 35 次。取其产物 10 $\mu$ l, 直接经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察结果。

### 1.5 DNA 的提取

取 1ml 单核细胞增多症李氏菌 (*L. monocytogenes*) 液体培养物于 8000r/min 离心 5min 后, 弃上清, 收集菌体, 按下述方法分别提取菌体 DNA。

1.5.1 A 法: 将收集的菌体溶于 2ml 的 20mmol/L tris-1mmol/L EDTA (pH8.0)-20% 蔗糖-新鲜溶菌酶 10mg/ml, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 45min, 然后加入 3 倍于上述体积的 10mmol/L tris-1mmol/L EDTA (pH8.0)-1% SDS-蛋白酶 K (1mg/ml), 继续孵育 1h 后, 用氯仿苯酚混合提取法<sup>[3]</sup>抽提 DNA, 最后加入 2 倍体积的冷纯乙醇, 离心收集 DNA, 并溶于 20 $\mu$ l 灭菌纯双蒸馏水。

1.5.2 B 法: 省去氯仿苯酚混合提取法步骤, 同上法提取 DNA。

1.5.3 C 法: 细菌于 Tris-EDTA-蔗糖-溶菌酶溶液内按上述方法处理后, 直接加入冷纯乙醇, 离心收集菌体 DNA。

### 1.6 细菌计数及不同浓度细菌 DNA 的提取

将细菌接种在 LB 液体培养基中过夜培

养, 涂布在 LB 琼脂平板上进行菌落计数, 确定其 CFU 后, 做 10 倍递次稀释至  $10^{-12}$ , 按方法 A 提取 DNA。

### 1.7 模拟肉样的制备

取分离培养法验证无单核细胞增多症李氏菌污染的健康猪肉 50g, 加 450ml Butterfield 缓冲液 (pH7.2), 在组织匀浆器中 8000r/min 匀质处理 1min, 做 10 倍稀释。

### 1.8 样品的采集处理及细菌的分离培养

猪肉样品采自山西临猗、太原和太谷的自由市场。取待检猪肉 1g, 研碎稀释后加入 90ml 改良的 Fraser 增菌液中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 离心收集菌体, 提取 DNA。细菌的分离培养与鉴定按柳增善等<sup>[4]</sup>的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 3 种扩增程序的比较

按 PCR 反应条件中的各反应物浓度和扩增次数, 进行以下 3 种扩增程序的比较: (1) Deneer 等<sup>[2]</sup>建议的扩增程序, 即 95 $^{\circ}$ C 45s (变性), 60 $^{\circ}$ C 45s (复性), 72 $^{\circ}$ C 1min (延伸), 扩增结果为阴性或弱阳性。(2) 变性、延伸条件同上, 但复性温度降至 50 $^{\circ}$ C 时, 出现非特异性扩增片断。(3) 95 $^{\circ}$ C 1min (变性), 55 $^{\circ}$ C 1min (复性), 72 $^{\circ}$ C 1min (延伸), 扩增出明显的特异性产物条带。

由此可见, 95 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min 和 72 $^{\circ}$ C 1min 为最适扩增程序。

### 2.2 Taq DNA 聚合酶的标化

2.2.1 华美生物工程公司的 Taq DNA 聚合酶标化: 在其它反应条件相同时, 分别向反应液中加入 1、3、5、6、8U 的 Taq DNA 聚合酶, 采用 95 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min 和 72 $^{\circ}$ C 1min 的扩增程序进行扩增, 结果 Taq DNA 酶的最佳用量为 5—6U。量再增大, 虽然不见特异性降低, 但灵敏度也不增加, 酶用量小于 3U 时, 灵敏度降低。

2.2.2 美国 PE 公司的 Taq DNA 聚合酶标化: 首先用 PCR 缓冲液将聚合酶稀释至 1U/ $\mu$ l, 然后分别向反应液中加入 2、3、4、5、6U

的酶量,在其它反应条件相同的情况下进行扩增,结果最佳 Taq DNA 酶用量为 3U,酶量过大过小都会使扩增的灵敏度降低。

### 2.3 MgCl<sub>2</sub> 浓度的标化

反应液中的 MgCl<sub>2</sub> 浓度分别取以 0.5mmol/L 之差由 0.5、1、1.5…递增至 10mmol/L,按 PCR 反应条件扩增,结果,反应液中的 MgCl<sub>2</sub> 浓度为 1mmol/L 时,扩增效果最佳。MgCl<sub>2</sub> 浓度过大 (>3.5mmol/L),非特异性增加,灵敏度降低;其浓度过小 (<0.5mmol/L) 也会使反应的灵敏度大大降低。

### 2.4 引物浓度的标化

反应液中的引物浓度分别取 0.1、0.5、1、1.5、2.0μmol/L 进行扩增。结果,高引物浓度的反应液 (>1μmol/L) 均出现明显的扩增条带,而低引物浓度 (<0.5μmol/L) 均无扩增产物条带。本着经济、灵敏的原则,整个试验均采用 1μmol/L 的引物浓度。

### 2.5 不同 DNA 提取方法的效果比较

用 A、B、C 法提取的 DNA 分别进行 PCR 扩增,结果仅 A 法提取的 DNA 出现扩增产物条带,而 B、C 法提取的 DNA 没有出现特异的扩增产物条带。

### 2.6 试剂盒的质量鉴定

**2.6.1 模拟肉样的敏感性测定:**将经过计数的单核细胞增多症李氏菌液体培养物,加到模拟肉样稀释液中,再作适当的系列稀释,并分别取 1ml 离心收集菌体,提取 DNA,用研制的成套试剂进行检测,结果可检测到样品中至少有 320 CFU 细菌。

**2.6.2 特异性测定:**用研制的成套试剂分别对 10<sup>6</sup>CFU 的 12 株不同血清型单核细胞增多症李氏菌,其它种李氏菌 (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*) 和细菌 (肠球菌、化脓链球菌、巴氏杆菌、大肠杆菌、普通变形杆菌、金黄色葡萄球菌、猪丹毒杆菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、耶尔森氏菌) 做模拟污染肉样进行检测。结果,12 株不同血清型单核细胞增多症李氏菌污染的肉样均产生特异性扩增产物条带,而其它种李氏菌和细菌污

染的肉样没有产生扩增产物条带。

**2.6.3 重复性测定:**以同批试剂对单核细胞增多症李氏菌、无害李氏菌 (*L. innocua*)、绵羊李氏菌 (*L. ivanovii*)、沙门氏菌、副溶血弧菌和耶尔森氏菌的 DNA 模板以 1 周间隔重复检测 5 次。结果,每种菌五次检测结果完全符合,该试剂重复性良好。

**2.6.4 猪肉样品的检测:**用研制的成套 PCR 试剂和分离培养法平行对 156 份猪肉样品进行检测,结果 PCR 试剂检出 9 份阳性样品,阳性率为 5.8%;分离培养法检出 6 份阳性样品,阳性率为 3.8%,两者的符合率为 97%。在每批试验中,以分离培养法检测为阴性的猪肉样品做阴性对照,以单核细胞增多症李氏菌的 DNA 模板做阳性对照。

## 3 讨论

本试验结果表明,我们所选用的国产酶质量不稳定,这不仅表现在不同批次酶之间,而且表现在同批次的酶之间,其活性仅相当于进口酶的  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ ,与国产酶相比,进口酶价格较贵,但质量稳定,活性较强。所以使用国产酶前必须先进行标化。

由于合成的引物中常有杂质,所以合成单位提供的引物量中,杂质常占有相当比例。因此,每批引物应用前,必须首先适当稀释,进行扩增,以确定最适引物浓度。反应液中 MgCl<sub>2</sub> 浓度对反应的灵敏度也有很大影响,使用前也需标化。

试验结果还表明,反应液量由 50μl 减到 20μl,其特异性和敏感性不会受到影响,并且节省了试剂和费用。扩增程序中,复性温度必须采用 55℃,低于 50℃时易出现非特异性扩增,高于 60℃时,反应的灵敏度降低。提纯 DNA 模板时,必须采用氯仿苯酚混合法,否则会大大降低反应的灵敏度,这可能与 DNA 模板中某些能抑制 Taq DNA 酶活性的杂质有关。为提高检出率,待检肉样研碎后还需进一步稀释,使其中的某些 Taq DNA 酶抑制剂的抑制作用降低。

本实验操作简便,所用仪器为一般常规仪器,检验人员经短期训练即可掌握。样品处理方法,可浓缩细菌 DNA,更适于细菌量较少样品的检测。此外,检测时间缩短,从处理样品到获得结果,一般不超过 2d,当使用国产常规水浴箱时,更为便利。我们认为应用本试验研制的试剂盒检测猪肉中的单核细胞增多症李氏菌,具有特异、敏感、快速和简便的优点,适于推广应用。

## 参 考 文 献

- [1] Bessen M T, Qian Luo, Rotbart H A, et al. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**: 2930—2932.
- [2] Deneer H G, Boychuk I. Appl Environ Environ, 1991, **57**: 606—609.
- [3] 林万明 (主编). 细菌分子遗传学分类鉴定法, 上海: 上海科技出版社, 1990.
- [4] 柳增善, 刘明远. 兽医大学学报, 1991, **90**: 5—9.

## THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF RAPID PCR KIT FOR DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN PORK

Yang Bailiang Ding Wei

(Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Xue Yingzhao

(Linyi Animal Quarantine Station, Linyi 044100)

**Abstract** A kit of rapid PCR for detection of *L. monocytogenes* has been developed and used to detect the bacteria in pork samples in parallel with the routine culture method with the result that positive rate was 5.8% for the former and 3.8% for the latter, and as few as 320 CFU bacteria could be detected. No significant differences were found between the results of both methods ( $p > 0.05$ ). The results also showed that the rapid PCR kit had good specificity and reproductivity, and required less than 48h to go from sample to a final result. It is concluded that the rapid PCR kit is applicable to detect *L. monocytogenes* in pork.

**Key words** PCR kit, *Listeria monocytogenes*, Pork, Detection